

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALES BÜRO  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 15/12, C07K 14/47, A61K 38/17, 39/395, G01N 33/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/15651</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/E:98/05924  (22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1998 (17.09.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 41 607.1 20. September 1997 (20.09.97) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): PRI- ONICS AG [CH/CH]; Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich (CH).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MOSER, Markus [CH/CH]; Waidfussstrasse 25, CH-8037 Zürich (CH). OESCH, Bruno [CH/CH]; Haldenstrasse 13, CH-5233 Stilli (CH). KORTH, Carsten [DE/US]; 1534 Cole Street, San Francisco, CA 94117 (US).  (74) Anwalt: EMMEL, Thomas; Schaefer & Emmel, Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BG, BR, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KP, KR, I.K, LR, LS, LT, LU, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TR, UA, UG, US, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	

(54) Title: SYNTHETIC POLYPEPTIDE FOR DIAGNOSING AND TREATING PRION-RELATED DISEASES

**(54) Bezeichnung:** SYNTHETISCHE POLYPEPTIDE ZUR DIAGNOSE UND THERAPIE VON PRIONERKRANKUNGEN

**(57) Abstract**

The invention relates to a synthetic polypeptide which contains one or more defined sequences of PrP or derived sequences therefrom which are detected by PrPSc bonding substances.

### (57) Zusammenfassung

Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrPSc-bindenden Substanzen erkannt werden.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshon	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

---

## Synthetische Polypeptide zur Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

---

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf synthetische Polypeptide, die insbesondere bei der Diagnose, Vorbeugung und Behandlung von einer Reihe von übertragbaren, degenerativen neurologischen Erkrankungen Verwendung finden können. Diese Erkrankungen werden unter dem Begriff spongiforme Enzephalopatien oder auch Prionerkrankungen zusammengefaßt. Sie treten in unterschiedlichen Säugetierspezies auf, z.B. als Scrapie bei Schafen, als BSE bei Kühen und als Kuru oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen.

Als einziges mit dem infektiösen Agens assoziiertes Molekül wurde bislang ein krankheitsspezifisches Prionprotein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) gefunden, das eine abnorme Isoform eines normalen Wirtsproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) unbekannter Funktion ist. Beide Isoformen  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und  $\text{PrP}^{\text{C}}$  stimmen bezüglich Molekulargewicht und Aminosäuresequenz überein. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Faltung und ihren Eigenschaften. Während z.B.  $\text{PrP}^{\text{C}}$  überwiegend  $\alpha$ -helicale Sekundärstrukturen besitzt,

löslich und proteaseverdaulich ist, weist PrP<sup>Sc</sup> vor allem  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf, ist unlöslich und kann von Proteasen nur teilweise abgebaut werden. Viele Indizien, insbesondere die Abwesenheit von anderen Molekülen außer PrP<sup>Sc</sup> im Prion, und vor allem die Abwesenheit von Nukleinsäuren, deuten darauf hin, daß PrP<sup>Sc</sup> eine (wenn nicht die) zentrale Rolle bei der Auslösung der oben genannten Krankheiten zukommt. Es wird angenommen daß PrP<sup>Sc</sup>-Proteine in der Lage sind, normale PrP<sup>C</sup>-Proteine in die krankheitsspezifische Faltung zu konvertieren, was die Infektiosität von PrP<sup>Sc</sup>-Proteinen erklären würde.

Es scheint daher vielversprechend ausgehend von PrP<sup>Sc</sup> als zentralem Krankheitsmolekül Therapie- oder Diagnosemöglichkeiten zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist in diesem Zusammenhang, synthetische Polypeptide bereitzustellen, die immunogene Eigenschaften oder generell Bindungseigenschaften des PrP<sup>Sc</sup> nicht jedoch dessen Infektiosität aufweisen.

Gelöst wird die Aufgabe mit synthetischen Polypeptiden entsprechend des Anspruches 1.

Es handelt sich dabei um Polypeptide, die eine oder mehrere definierte Sequenzen des PrP (PrP bezeichnet das Prionprotein im allgemeinen unabhängig von seiner Konformation) enthalten, wobei diese Sequenzen von PrP<sup>Sc</sup>-bindenden Substanzen in z.B. den weiter unten beschriebenen Mapping-Experimenten erkannt werden. Es gibt eine ganze Reihe von unterschiedlichen PrP<sup>Sc</sup>-spezifisch bindenden Substanzen. Beispiele hierfür sind weiter unten angegeben.

Zusammengefaßt enthalten die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide damit mindestens eine Sequenz, die im nativen PrP<sup>Sc</sup> an dessen Oberfläche an-

geordnet ist und dort alleine oder in Verbindung mit weiteren der im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Sequenzen eine Bindungsstelle bilden. An der Ausbildung dieser PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen Oberflächenstrukturen ist mindestens eine der beiden im Strukturmodell des rekombinanten PrP vorhandenen  $\beta$ -Faltblattstrukturen, oder beide, beteiligt. Es wird angenommen, daß diese Strukturen im PrP<sup>Sc</sup> als Nukleationspunkt bei der Ausbildung der Oberfläche einen dominierenden Einfluß haben.

Künstliche Polypeptide, die im nativen PrP<sup>Sc</sup> vorhandene Bindungsstellen simulieren, können sowohl zur Therapie oder Diagnose als auch zur Vorbeugung und sonstigen Anwendungszwecken von Interesse sein.

Unter die Erfindung fallen insbesondere synthetische Polypeptide, die einen oder mehrere der im Anspruch 2 genannten folgenden Sequenzbereiche aufweisen:

- a) Gly-R<sub>1</sub>-Asp-R<sub>2</sub>-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
- b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro- R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr- R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)
- c) Cys-R<sub>7</sub>-Thr-Gln-Tyr-R<sub>8</sub>-R<sub>9</sub>-Glu-Ser-R<sub>10</sub>-Ala-(R<sub>11</sub>-Tyr)
- d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R<sub>12</sub>-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R<sub>1</sub> = Asn oder Ser, R<sub>2</sub> = Trp oder Tyr, R<sub>3</sub> = Arg oder Lys, R<sub>4</sub> = Met, Val oder Ala, R<sub>5</sub> = Gln, Glu oder Arg, R<sub>6</sub> = Ser oder Asn, R<sub>7</sub> = Val, Thr oder Ile, R<sub>8</sub> = Gln oder Glu, R<sub>9</sub> = Lys, Arg oder Gln, R<sub>10</sub> = Gln oder Glu, R<sub>11</sub> = Tyr, Ser oder Ala und R<sub>12</sub> = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

Weitere synthetische Polypeptide im Rahmen der Erfindung können nach Anspruch 3 eine oder mehrere der folgenden Sequenzen enthalten:

- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
- f) Lys-Pro-R<sub>14</sub>-Lys-Pro-Lys-Thr-R<sub>14</sub>-R<sub>15</sub>-Lys-His-R<sub>16</sub>-Ala-Gly
- g) Tyr-R<sub>16</sub>-Leu-Gly-Ser
- h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro-R<sub>17</sub>-R<sub>17</sub>-His-Phe-Gly-R<sub>14</sub>-Asp
- i) Asn-Met-R<sub>18</sub>-Arg-Tyr-(Pro-R<sub>14</sub>)-(Gln-Val-Tyr-Tyr-R<sub>19</sub>)

in denen R<sub>14</sub>= Asn oder Ser, R<sub>15</sub>= Met, Leu oder Phe, R<sub>16</sub>=Met oder Val, R<sub>17</sub>= Ile, Leu oder Met, R<sub>18</sub>= His, Tyr oder Asn und R<sub>19</sub>= Lys oder Arg ist und die in Klammern gesetzten Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

Die Sequenzen gemäß Anspruch 2 und 3 wurden in sogenannten "Mapping-Experimenten" auf einer immobilisierten Peptidbank gefunden. Auf der benutzten Peptidbank (erhältlich von Jerini Biotools, Berlin) sind 104 Peptide mit jeweils 13 Aminosäuren mit ihrem C-terminalen Ende auf einer Cellulosemembran befestigt. Sie decken die gesamte Sequenz des PrP (PrP bezeichnet im folgenden generell die dem Prionprotein zugrundeliegende Aminosäuresequenz unabhängig von der Konformation) ab und sind so angeordnet, daß sie um jeweils zwei Aminosäuren verschoben sind, d.h. jeweils 11 Aminosäuren zwischen zwei benachbarten Peptiden überlappen. In mehreren Mapping-Experimenten wurden Peptidbanken mit unterschiedlichen PrP<sup>Sc</sup> bindenden Substanzen beaufschlagt und die Bindung dieser Substanzen an spezielle Sequenzbereiche unter Verwendung z.B. eines Chemolumineszenz-Kits (ECL, Amersham, USA) sichtbar gemacht.

Zur Ermittlung der Sequenzen gemäß Anspruch 2 wurden in "Mapping-Experimenten" als PrP<sup>Sc</sup>-bindende Substanzen ein PrP<sup>Sc</sup>-spezifischer Antikörper mit der Bezeichnung 15B3 und (wie in eigenen Vorversuchen gezeigt wurde

ebenfalls PrP<sup>Sc</sup>-spezifisches) rekombinantes bovines-PrP (rbPrP) mit der in Fig 4 angegebenen Sequenz eingesetzt. Zur Herstellung von rbPrP kann z.B. eine Zelllinie (z.B. E. coli) mit einem Vektor, der rbPrP exprimiert, in einem geeigneten Medium (z.B. Luria-Broth) angezogen und dann aus den Inklusionskörpern der Zellen nach Lysis und weiteren konventionellen Reinigungsmethoden das Prion-Protein isoliert werden (siehe auch Hornemann et al., FEBS-Letters (97) 413 (2; 277-281)).

Bei 15B3 handelt es sich um einen unlängst von den Erfindern entdeckten monoklonalen PrP<sup>Sc</sup>-Antikörper. Hybridomazellen, die die genannten (PrP<sup>Sc</sup> spezifischen) Antikörper 15B3 produzieren, wurden am 13. Februar 1997 unter der Nummer DSM ACC2298 bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig hinterlegt.

In beiden Fällen erkannten die beiden unterschiedlichen bindenden Substanzen, der Antikörper 15B3 und das rekombinante rbPrP übereinstimmend die Sequenzen a-d gemäß Anspruch 1, wie für 15B3 in Fig. 1 und für rbPrP in Fig. 2 wiedergegeben.

Die in Fig 1 und 2 angegebenen Nummern bezeichnen die unterschiedlichen Peptidsequenzen der Bank, an denen der monoklonale Antikörper 15B3 bzw rbPrP bindet. Die erfindungsgemäßen Sequenzen entsprechen dabei jeweils den den jeweiligen räumlich benachbarten Bindungspeptiden gemeinsamen Bereichen. Fig. 2 gibt dabei wie bereits erwähnt das Ergebnis eines Mappingexperimentes wieder, dessen Bedingungen dem in Fig. 1 dargestellten Experiment entsprechen. Hier wurde lediglich der Antikörper 15B3 gegen rekombinantes bovines rbPrP ausgetauscht. Die Bindungsstellen des rekombinanten rbPrP sind auf der aus technischen Gründen nicht besser wiederzugebenden Darstellung mit



Markierungen hervorgehoben. Es handelt sich um mit Fig. 1 übereinstimmende Bindungsstellen.

Die in Anspruch 3 angegebenen Sequenzen wurden ebenfalls mittels Mappingexperimenten ermittelt. Allerdings wurde hier als erkennende Substanz nicht ein Antikörper oder rbPrP, sondern der Farbstoff Kongorot eingesetzt, dessen spezifische Bindung für PrP<sup>Sc</sup> bereits seit längerem bekannt ist (Prusiner et al., Cell 35, 349-358; 1983). Fig. 3 zeigt die entsprechende Peptidbank mit den angefärbten Bindungsbereichen, aus denen wie oben angegeben die Sequenzen e-i ermittelt wurden.

In den Fig. 1-3 erkennt man, daß es sich bei den Sequenzen a-d bzw e-i um nicht linear zusammenhängende Sequenzen aus PrP handelt. An einem 3-dimensionalen Modell eines C-terminalen Fragments von rekombinantem Maus-PrP konnte gezeigt werden, daß sich hier zwei der im Anspruch 2 angegebenen Sequenzen a-d in räumlicher Nähe zueinander befinden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist davon auszugehen, daß bei der Konformationsänderung auch die beiden anderen Sequenzen eine andere Position einnehmen, dergestalt daß im PrP<sup>Sc</sup> wohl alle vier Sequenzen a-d benachbart angeordnet sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein konformationelles Epitop ausbilden.

Die beanspruchten Sequenzen stellen damit Sequenzbereiche dar, die in einer Peptidbank einzeln von z.B. einem PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen Antikörper erkannt werden und die darüber hinaus mit hoher Wahrscheinlichkeit im nativen PrP<sup>Sc</sup>-Protein einzeln oder zu mehreren einen oberflächlichen Bindungsbereich, z.B. ein Epitop ausbilden. Unter Epitop wird der spezifische antigene Ort auf der Oberfläche des PrP<sup>Sc</sup>-Proteins verstanden, der z.B. durch das Idiotyp von 15B3 gebunden werden kann.

Erfindungsgemäß werden damit synthetische Polypeptide bereitgestellt, die im Mindestfall eine der von den genannten PrP<sup>Sc</sup> bindenden Substanzen in der Peptidbank erkannten Sequenzen (sowie möglicherweise zusätzliche) enthalten.

Künstliche Polypeptide, die einen antigenen Bereich von PrP<sup>Sc</sup> aufweisen, sind bereits in der WO 93/11153 angegeben worden. Die dort genannten Sequenzen stellen relativ umfangreich Ausschnitte aus der PrP-Sequenz dar. Die genaue Abgrenzung einer Sequenz, die z.B. ein Epitop ausbildet oder daran beteiligt ist, fehlt, was insbesondere den räumlichen Nachbau von minimalen synthetischen Polypeptiden mit z.B. der immunogenen Wirkung von PrP<sup>Sc</sup> erschwert bzw. unmöglich macht.

Wie oben ausgeführt, können die synthetischen Polypeptide im Minimalfall lediglich aus einer der z.B. im Anspruch 2 oder genannten Sequenzen bestehen. Es ist aber auch möglich, sie mit geeigneten weiteren Sequenzen, die im Folgenden Konformationssequenzen genannt werden, zu verbinden.

Theoretisch wäre es z.B. möglich, z.B. die Sequenzen ggf. über diese Konformationssequenzen und eventuelle weitere Sequenzen dergestalt untereinander zu verbinden, daß die vermutete räumliche Anordnung im PrP<sup>Sc</sup>-Protein simuliert wird. Im Idealfall würde man auf diese Weise ein Protein mit einer Oberfläche (Epitop) erhalten, in dem wie im PrP<sup>Sc</sup> mehrere räumlich benachbarte Bindungsstellen enthalten sind.

Erfindungsgemäß ist in einer Ausgestaltung zunächst jedoch vorgesehen, lediglich eine der beanspruchten Sequenzen (Sequenz b) dergestalt mit einer Konformationssequenz zu verknüpfen, daß ein synthetisches Polypeptid mit ausreichender immunogener Bindungswirkung z.B. für 15B3 entsteht, wie Untersuchungen

der Erfinder zeigten. Ein Polypeptid in dieser Ausgestaltung kann eine der beiden folgenden Sequenzen aufweisen:

- j) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R<sub>13</sub>)-Z-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro-R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr-R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)-(Y)
- k) (X)-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro-R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr-R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R<sub>13</sub>)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z.B. Gly-Gly ist, R<sub>3</sub> = Arg oder Lys, R<sub>5</sub> = Gln, Glu oder Arg, R<sub>6</sub> = Ser oder Asn und R<sub>13</sub> = Met oder Val ist und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

Die Sequenz j enthält in ihrem C-terminalen Bereich die Sequenz b, die über z.B. den Spacer Gly-Gly mit der sich N-terminal anschließenden Konformationssequenz verbunden ist. In der Sequenz k ist die Abfolge genau umgekehrt. Weitere geeignete Spacer sind generell alle solche Sequenzen, die ausreichende Flexibilität zwischen den verbundenen Peptidbereichen gewährleisten und keinen Einfluß auf die Konformation haben.

Beide bevorzugt eingesetzten synthetischen Polypeptide wurden ausgehend von der Feststellung konzipiert, daß in PrP<sup>Sc</sup> verstärkt  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen auftreten, wobei in aller Regel sequenzauf- oder abwärts eine Konformationssequenz vorliegt, die eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur induziert. Die synthetischen Polypeptide gemäß Anspruch 6 wurden daher mit geeigneten Konformationssequenzen ausgestattet, um die Epitopsequenz in einer für PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur anzuordnen.

Wie allgemein bekannt, können Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Größe und ihrer Polarität bzw. Ladung unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden. Man nennt die in eine Gruppe fallenden Aminosäuren untereinander homolog und unterscheidet folgende 5 Gruppen:

- 1.) Kleine aliphatische nicht polare oder nur geringfügig polare Säuren:

Alanin, Serin, Threonin und in Grenzen Glycin, Prolin

- 2.) Polare, negativ geladene Säuren und ihre Amide

Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Glutamin

- 3.) Polare, positiv geladene Säuren:

Histidin, Arginin, Lysin

- 4.) Große aliphatische, nicht polare Säuren:

Methionin, Leucin, Isoleucin, Valin, Cystein

- 6.) Große aromatische Säuren:

Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

In vielen Fällen können in Peptidsequenzen enthaltene Aminosäuren durch entsprechende Säuren aus derselben Gruppe ersetzt werden, ohne daß die Eigenschaften der Sequenz dadurch eine Änderung erfahren. Unter die Erfindung fallen daher auch solche Sequenzen, die nicht den explizit genannten Formeln entsprechen, sondern in denen ein Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren gegen eine homologe Säure vorgenommen wurde.

Weiterhin kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, daß Aminosäuresequenzen unabhängig von ihrer Bildungsrichtung unter bestimmten Umständen ähnliche Bindungseigenschaften, insbesondere Antikörperbindungseigenschaften haben können. Man spricht in diesem Fall von retro-Aminosäuresequenzen und bezeichnet damit übereinstimmende Sequenzen, die in C-oder N-terminaler Richtung gebildet sind (z.B. [N-terminal]-Glu-Ala-Val-Leu-[C-terminal], [N-

terminal]-Leu-Val-Ala-Glu-[C-terminal]). Falls die verwendeten Aminosäuren statt der in Tieren vorkommenden L-Form in der chiralen D-Gegenform vorliegen, so werden die Epitopbereiche spiegelbildlich ausgebildet und ebenfalls von einigen Antikörpern erkannt, wobei sich die Isotypen der Antikörper in diesen Eigenschaften unterscheiden. Man spricht in diesem Fall von inverso-Aminosäuresequenzen. Falls sowohl inverso als auch retro-Aminosäuren verwendet werden, ergeben sich z.B. übereinstimmende Epitopbereiche, die uneingeschränkt von dem zur ursprünglichen Sequenz spezifischen Antikörper gebunden werden. Der Vorteil der Verwendung von z.B. retro-inverso-Aminosäuresequenzen besteht darin, daß D-Aminosäuren vom Organismus langsamer abgebaut werden, da sie von den abbauenden Enzymen schlechter erkannt werden. Der gleiche Effekt kann auch durch die Substitution von nicht natürlichen Aminosäuren erzielt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können daher auch in retro- und/oder inverso Form vorliegen oder weiterhin auch nicht natürliche (also nicht von Organismus produzierte) Aminosäuren enthalten. Nichtnatürliche Aminosäuren lassen sich durch Synthetisierung von z.B. zusätzlichen Seitenketten oder reaktiven Gruppen gezielt mit speziellen Eigenschaften und an bestimmte Anwendungszwecke angepaßt herstellen.

Wie oben ausgeführt, können die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide insbesondere bei der Behandlung, Vorbeugung oder auch Diagnose von Prionerkrankungen eingesetzt werden.

Es ist insbesondere daran gedacht, die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide als Impfstoff darzustellen. Dazu wird z.B. eine ausreichende Menge Peptid mit Freund's komplettem Adjuvans aufgelöst und subkutan oder intramuskulär injiziert. In mehrwöchigen Abständen wird wiederum eine immunogene Menge Peptid in Freund's inkomplettem Adjuvans aufgelöst und injiziert (Boost). Ziel der Impfung ist, eine Immunantwort zu provozieren, die die endogene Produktion

von Antikörpern beinhaltet, die spezifisch PrP<sup>Sc</sup> erkennen und neutralisieren bzw. kennzeichnen können, so daß körpereigene Abwehrmechanismen einer Erkrankung vorbeugen bzw. den Krankheitsprozeß verlangsamen bzw. stoppen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die synthetischen Polypeptide in der Diagnose und Therapie einzusetzen. Nach der herrschenden Konversionstheorie wird davon ausgegangen, daß PrP<sup>Sc</sup> und/oder PrP<sup>C</sup> auch untereinander binden. Gestützt wird diese Annahme durch weitere Mappingversuche der Erfinder, in denen gezeigt wurde, daß (wie aus Fig. 2 zu entnehmen) rekombinantes bovines rbPrP an ähnlichen Sequenzbereichen bindet wie der oben genannte Antikörper 15B3.

Die erwähnten Bindungseigenschaften kann man sich z.B. bei der Therapie zunutze machen. Denkbar wäre, die erfindungsgemäßen Polypeptide in den Körper eines erkrankten Patienten hirngängig zu applizieren und dort dem infektiösen PrP<sup>Sc</sup> als Bindungspartner zur Verfügung zu stellen. Auf diese Weise könnte man die Konversionsrate möglicherweise drastisch senken und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Zu Diagnosezwecken wäre es denkbar, in Probenmaterial eventuell erhaltenes PrP<sup>Sc</sup> mittels der erfindungsgemäßen Polypeptide spezifisch zu binden und dann auf geeignete Weise nachzuweisen.

Die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide sind nicht auf die angegebenen Sequenzen beschränkt. Denkbar sind auch Peptide, die in derivatisierter Form vorliegen. Interessant könnte es z.B. sein, solche Peptide mit einem Carrier bzw. Immunogen, wie z.B. Diphtheriatoxid oder BSA zur Verstärkung der Immunantwort zu verbinden. Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung wäre die Verknüpfung mit Markern, wie z.B. Biotin oder Peroxidase bzw. mit Enzymen oder Nukleinsäuren. Denkbar wäre schließlich auch, Signalsequenzen vorzuse-

hen, die die Durchgängigkeit der Peptide in gewünschte Kompartimente erleichtern. Gedacht ist dabei insbesondere an die Blut-Hirn-Schranke, deren Passage durch Verwendung von Signalsequenzen, die z.B. an Transferrinrezeptor binden, erleichtert werden könnten.

Wie oben mehrfach angesprochen, sollen die erfindungsgemäßen synthetischen Polypeptide bei der Therapie, Diagnose und Prophylaxe von Prionerkrankungen Verwendung finden. In Verbindung mit allen genannten Anwendungszwecken ist ein wesentliches Element, daß die erfindungsgemäßen Polypeptide einzeln oder in Verbindung mit weiteren Substanzen einem Patienten verabreicht werden, wobei, wie oben ausgeführt, derivatisierte Formen eingesetzt werden können, um die Gängigkeit in bestimmte Kompartimente zu erhöhen.

Die Herstellung der Polypeptide kann auf beliebige Weise erfolgen. Entweder direkt über übliche Peptidsynthese-Techniken oder aber auch indirekt über RNA- oder DNA-Synthese und dann mittels konventioneller molekularbiologischer Techniken. Dementsprechend richtet sich ein weiterer Aspekt der Erfindung auf ein DNA-Molekül, das in der Lage ist, eins der erfindungsgemäßen Polypeptide zu kodieren. Vorzugsweise wird ein solches DNA-Molekül (ggf. auch in einer längeren Sequenz) in einem geeigneten Expressionsvektor zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um Routinetechniken.

Die Erfindung richtet sich weiterhin auch auf einen Kit zur Diagnose von PrP<sup>Sc</sup> bzw. von Antikörpern gegen PrP<sup>Sc</sup>, der mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide enthält. Man macht sich hierbei die Tatsache zunutze, daß die Polypeptide spezifisch am PrP<sup>Sc</sup> und an den dagegen gerichteten Antikörpern zu binden vermögen.

Wie oben bereits angesprochen kann eine der zu Ermittlung der Polypeptidsequenzen eingesetzten bindenden Substanzen rekombinantes bovines rbPrP sein. Es hat sich überraschend herausgestellt, daß rekombinantes rbPrP in der Lage ist, spezifisch an PrP<sup>Sc</sup> zu binden und an der entsprechenden Peptidbank die selben Sequenzen zu erkennen, wie der Antikörper 15B3 (siehe Fig. 2).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft daher die Verwendung von rekombinantem rbPrP-Protein entsprechend der Sequenz in Fig 4. Es hat sich herausgestellt, daß bei Verabreichung von rekombinantem rbPrP mit der angegebenen Sequenz PrP<sup>Sc</sup>-spezifische Antikörper produziert werden. Diesen Effekt kann man sich insbesondere im Rahmen der Prophylaxe oder Therapie zunutze machen, indem man einem Patienten rekombinantes rbPrP als Impfstoff aufbereitet verabreicht und eine entsprechende Immunantwort auslöst.

Die Ausgestaltung ist selbstverständlich nicht auf die Verwendung von bovinem rbPrP gemäß Fig. 4 beschränkt. Genauso gut können rekombinante PrP-Sequenzen mit artspezifischen Abweichungen von der in Fig. 4 gezeigten rbPrP-Sequenz verwendet werden.

Schließlich betrifft die Erfindung auch noch ein Verfahren zur Herstellung von PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen Antikörpern. Zur Immunisierung wird nicht menschlichen Säugetieren mindestens eins der erfindungsgemäßen Polypeptide in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis verabreicht und der dagegen gebildete Antikörper mit üblichen Methoden isoliert.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich schließlich auch zur Verwendung in sogenannten pharmazeutischen oder chemischen Libraries, mit denen neue Wirkstoffe getestet bzw. ermittelt werden, die spezifisch an PrP<sup>Sc</sup> binden.



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Prionics AG  
(B) STRASSE: Wintherturerstr. 190  
(C) ORT: Zuerich  
(D) BUNDESLAND: Zuerich  
(E) LAND: Schweiz  
(F) POSTLEITZAHL: CH-8090

(A) NAME: Korth, Carsten  
(B) STRASSE: 1534 Cole Street  
(C) ORT: San Francisco  
(D) BUNDESLAND: Kalifornien  
(E) LAND: USA  
(F) POSTLEITZAHL: CA 94117

(A) NAME: Oesch, Bruno  
(B) STRASSE: Haldenstrasse 13  
(C) ORT: Stilli  
(E) LAND: Schweiz  
(F) POSTLEITZAHL: CH 5233

(A) NAME: Moser, Markus  
(B) STRASSE: Waidfussstrasse 25  
(C) ORT: Zuerich  
(D) BUNDESLAND: Zuerich  
(E) LAND: Schweiz  
(F) POSTLEITZAHL: CH-8037

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Synthetische Polypeptide zur  
Diagnose und Therapie von Prionerkrankungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (vi) DATEN DER URANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: DE 19741607.1  
(B) ANMELDETAG: 20-SEP-1997

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 219 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Bos taurus

## (viii) POSITION IM GENOM:

- (C) EINHEITEN: 219

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Met	Lys	Lys	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Trp	Asn	Thr	Gly	Gly	Ser	1	5	10	15
Arg	Tyr	Pro	Gly	Gln	Gly	Ser	Pro	Gly	Gly	Asn	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gln	20	25	30	
Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	35	40	45	
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	50	55	60	
His	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	Pro	His	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Gly	Gln	65	70	75	80
Gly	Gly	Thr	His	Gly	Gln	Trp	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Pro	Lys	Thr	Asn	85	90	95	
Met	Lys	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Gly	100	105	110	
Leu	Gly	Gly	Tyr	Met	Leu	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile	His	115	120	125	
Phe	Gly	Ser	Asp	Tyr	Glu	Asp	Arg	Tyr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Met	His	Arg	130	135	140	
Tyr	Pro	Asn	Gln	Val	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Val	Asp	Gln	Tyr	Ser	Asn	Gln	145	150	155	160
Asn	Asn	Phe	Val	His	Asp	Cys	Val	Asn	Ile	Thr	Val	Lys	Glu	His	Thr	165	170	175	
Val	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Phe	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	Lys	180	185	190	
Met	Met	Glu	Arg	Val	Val	Glu	Gln	Met	Cys	Ile	Thr	Gln	Tyr	Gln	Arg	195	200	205	
Glu	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Gly	Ala	Ser						210	215		

---

**PATENTANSPRÜCHE:**

1. Synthetisches Polypeptid, das eine oder mehrere definierte Sequenzen von PrP oder davon abgeleitete Sequenzen enthält, die von PrP<sup>Sc</sup> - bindenden Substanzen erkannt werden.
2. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mind. eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:
  - a) Gly-R<sub>1</sub>-Asp-R<sub>2</sub>-Glu-Asp-Arg-(Tyr-Tyr)
  - b) (Gln)-(Val)-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro- R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr- R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)
  - c) Cys-R<sub>7</sub>-Thr-Gln-Tyr-R<sub>8</sub>-R<sub>9</sub>-Glu-Ser-R<sub>10</sub>-Ala-(R<sub>11</sub>-Tyr)
  - d) (Tyr-Arg)-Glu-Asn-Met-R<sub>12</sub>-Arg-Tyr-Pro-Asn-(Gln-Val-Tyr)

in denen R<sub>1</sub> =Asn oder Ser, R<sub>2</sub> = Trp oder Tyr, R<sub>3</sub> = Arg oder Lys, R<sub>4</sub> = Met, Val oder Ala, R<sub>5</sub> = Gln, Glu oder Arg, R<sub>6</sub> = Ser oder Asn, R<sub>7</sub> = Val,

Thr oder Ile,  $R_8$  = Gln oder Glu,  $R_9$  = Lys, Arg oder Gln,  $R_{10}$  = Gln oder Glu,  $R_{11}$  = Tyr, Ser oder Ala und  $R_{12}$  = His, Tyr oder Asn ist und die in Klammern angegebenen Aminosäuren nicht zwingend vorhanden sind.

3. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 1, bei dem die Sequenz einer der folgenden Formeln entspricht und mind. eine der genannten Sequenzen oder eine Kombination mehrerer Sequenzen enthalten ist:
- e) Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln-Pro-His-Gly
  - f) Lys-Pro- $R_{14}$ -Lys-Pro-Lys-Thr- $R_{14}$ - $R_{15}$ -Lys-His- $R_{16}$ -Ala-Gly
  - g) Tyr- $R_{16}$ -Leu-Gly-Ser
  - h) Ser-Ala-Met-Ser-Arg-Pro- $R_{17}$ - $R_{17}$ -His-Phe-Gly- $R_{14}$ -Asp
  - i) Asn-Met- $R_{18}$ -Arg-Tyr-(Pro- $R_{14}$ )-(Gln-Val-Tyr-Tyr- $R_{19}$ )

in denen  $R_{14}$  = Asn oder Ser,  $R_{15}$  = Met, Leu oder Phe,  $R_{16}$  = Met oder Val,  $R_{17}$  = Ile, Leu oder Met,  $R_{18}$  = His, Tyr oder Asn und  $R_{19}$  = Lys oder Arg ist, und die in Klammern angegebenen Aminosäuren oder Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sind.

4. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Sequenz ggf. über eine übliche Spacersequenz mit einer "Konformations"-sequenz gekoppelt ist, die die Ausbildung einer definierten Konformation des synthetischen Polypeptids induziert.
5. Synthetisches Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die "Konformations"-sequenz die Ausbildung eines  $\beta$ -Strands induziert.

6. Synthetisches Polypeptid nach Anspruch 2, 4 und 5 entsprechend einer der folgenden Formeln :

e) (X)-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R<sub>13</sub>)-Z-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro-R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr-R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)-(Y)

f) (X)-Tyr-Tyr-R<sub>3</sub>-Pro-R<sub>4</sub>-Asp-R<sub>5</sub>-Tyr-R<sub>6</sub>-(Asn-Gln)-Z-(Gly)-Ala-Val-Val-Gly-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-(R<sub>13</sub>)-(Y)

wobei X und Y beliebige Aminosäuresequenzen sind, Z ein üblicher Spacer z.B Gly-Gly ist, R<sub>3</sub> = Arg oder Lys, R<sub>5</sub> = Gln, Glu oder Arg, R<sub>6</sub> = Ser oder Asn und R<sub>13</sub> = Met oder Val ist, und die in Klammern gesetzten Sequenzbereiche nicht zwingend vorhanden sein müssen.

7. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß es in mindestens einer Teilsequenz in retro-Form vorliegt.
8. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine der enthaltenen Aminosäuren in der D-Form vorliegt.
9. Synthetisches Polypeptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß es in derivatisierter Form vorliegt.
10. Pharmazeutische Zubereitung zur Therapie von Prionerkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mindestens eines der in den Ansprüchen 1 - 9 genannten synthetischen Polypeptide oder mind. eine die definierten Sequenzen erkennende PrP<sup>Sc</sup>-bindende Substanz in einer zur Therapie oder Vorbeugung ausreichenden Dosis enthält.

11. Mittel zur Diagnose von Prionerkrankungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es mindestens eines der in den Ansprüchen 1 - 9 genannten synthetischen Polypeptide oder mind. eine die definierten Sequenzen erkennende PrP<sup>Sc</sup>-bindende Substanz in einer für den jeweiligen Nachweis ausreichenden Dosis enthält.
12. Impfstoff zur Vorbeugung und Therapie von Prionerkrankungen mit mindestens einem der Polypeptide gemäß den Ansprüchen 1 - 9 oder mind. einer die definierten Sequenzen erkennende PrP<sup>Sc</sup>-spezifischen Substanz in einer zur Immunisierung ausreichenden Dosis.
13. Pharmazeutische Zubereitung, Mittel zur Diagnose oder Impfstoff nach einem der Ansprüche 9-12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die enthaltene PrP<sup>Sc</sup>-bindende Substanz rekombinant erzeugtes rbPrp mit der in Fig 4 wiedergegebenen Formel bzw. artspezifischer Abweichungen davon ist.
14. DNA-Molekül, das mindestens für eines der synthetischen Polypeptide nach den Ansprüchen 1 bis 9 kodiert.
15. Kit zur Detektion von PrP<sup>Sc</sup> bzw. von Antikörpern dagegen, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mindestens ein synthetisches Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 9 enthält.
16. Verfahren zur Herstellung von PrP<sup>Sc</sup> spezifischen Antikörpern, **dadurch gekennzeichnet**, daß nicht-menschliche Säugetiere mit mind. einem Polypeptid gemäß der Ansprüche 1-9 immunisiert werden und der bzw die dagegen gebildete(n) Antikörper nach einer zur Immunisierung ausreichenden Zeitperiode auf üblichem Wege aus dem Säugetier isoliert werden.

17. Verfahren zur Detektion von PrP<sup>Sc</sup> spezifischen Oberflächensequenzbereichen, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine PrP-spezifische Peptidbank mit PrP<sup>Sc</sup> bindenden Substanzen inkubiert und mittels gängiger Visualisationstechniken die bindenden Bereiche der Peptidbank sichtbar gemacht und daraus die Sequenzbereiche ermittelt werden.
18. Verwendung der Polypeptide nach den Ansprüchen 1-9 in einer pharmazeutischen oder chemischen Library zur Detektion von von PrP<sup>Sc</sup> -spezifischen Wirkstoffen.

1/3

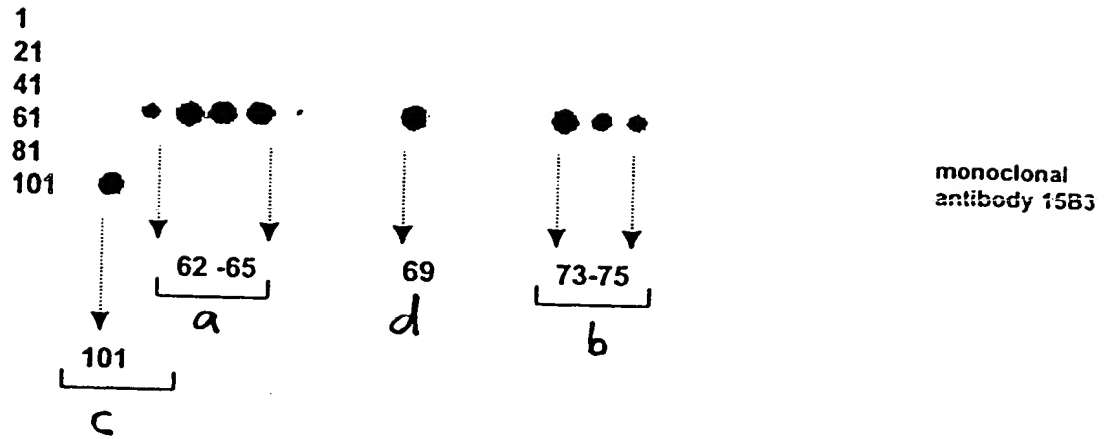


Fig 1

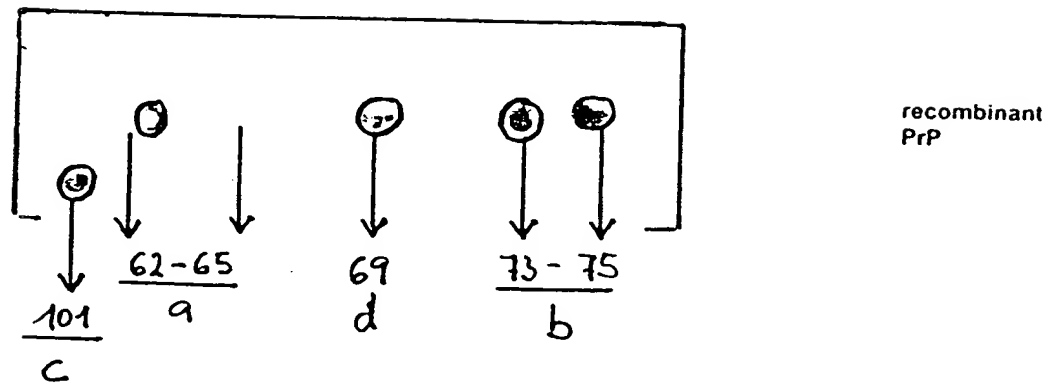


Fig 2



2/3

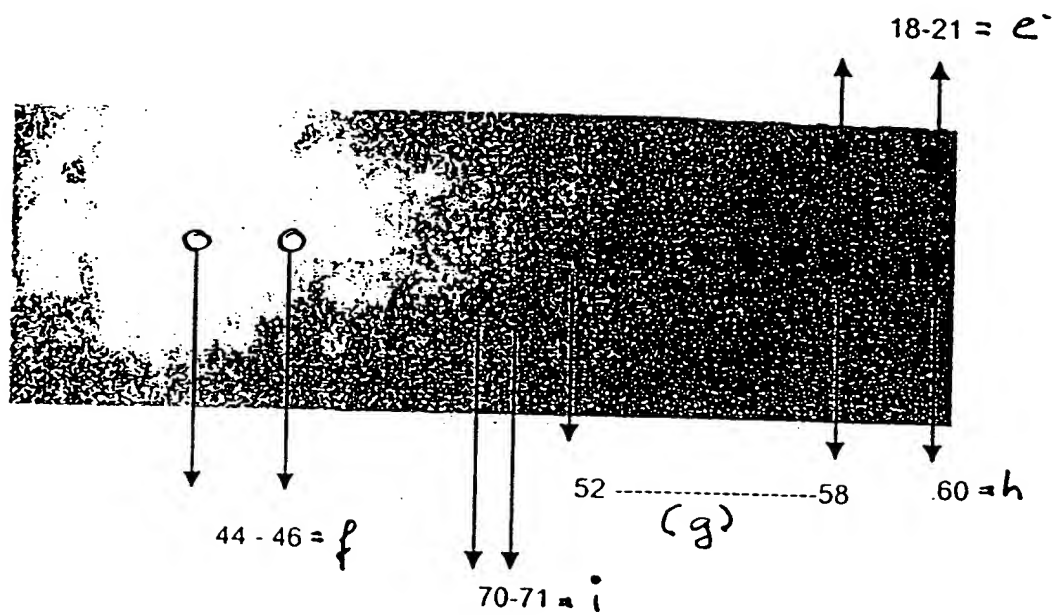


Fig 3

3/3

Met Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln  
 20 25 30  
 Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro  
 35 40 45  
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro  
 50 55 60  
 His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Thr His Gly Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn  
 85 90 95  
 Met Lys His Val Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly  
 100 105 110  
 Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Leu Ile His  
 115 120 125  
 Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg  
 130 135 140  
 Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Val Lys Glu His Thr  
 165 170 175  
 Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys  
 180 185 190  
 Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg  
 195 200 205  
 Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser  
 210 215

Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05924

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 11155 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN) 10 June 1993 see page 3, line 2 - line 24 see page 23, line 14 - line 22 see page 28, line 29 - page 29, line 29; claims; examples ---	1-3,7-17
X	WO 97 16728 A (UNIV CALIFORNIA) 9 May 1997 see page 6, line 11 - line 24; claims; examples; table 1 ---	1,3,10
P,X	EP 0 861 900 A (ZUERICH ERZIEHUNGSDIREKTION) 2 September 1998 see page 8, line 54 - page 9, line 8 see page 14, line 54 - page 15, line 37; claims; examples --- -/--	1-3, 10-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 1999

Date of mailing of the international search report

24/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05924

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	KORTH, C. ET AL: "Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody" NATURE (LONDON) (1997), 390(6655), 74-77 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, 6 November 1997, XP002092791 see the whole document ---	1-3, 10-18
P,X	WO 98 35236 A (ENFER TECH LTD ;CONNOR MICHAEL O (IE)) 13 August 1998 see claims; examples ---	1-3,7-17
A	WO 93 23432 A (UNIV NEW YORK ;INST NAZIONALE NEUROLOGICO C B (IT)) 25 November 1993 see claims; examples -----	1-17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05924

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9311155 A	10-06-1993	AU 675053 B	23-01-1997
		AU 3089292 A	28-06-1993
		CA 2124953 A	10-06-1993
		EP 0616613 A	28-09-1994
		JP 7501798 T	23-02-1995
		NZ 246059 A	28-08-1995
		US 5773572 A	30-06-1998
		ZA 9209392 A	27-07-1993
WO 9716728 A	09-05-1997	US 5750361 A	12-05-1998
		AU 7601296 A	22-05-1997
EP 0861900 A	02-09-1998	WO 9837210 A	27-08-1998
		AU 6498698 A	09-09-1998
WO 9835236 A	13-08-1998	AU 6004698 A	26-08-1998
WO 9323432 A	25-11-1993	AU 4376093 A	13-12-1993

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C07K14/47 A61K38/17 A61K39/395 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 11155 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN) 10. Juni 1993 siehe Seite 3, Zeile 2 - Zeile 24 siehe Seite 23, Zeile 14 - Zeile 22 siehe Seite 28, Zeile 29 - Seite 29, Zeile 29; Ansprüche; Beispiele ---	1-3, 7-17
X	WO 97 16728 A (UNIV CALIFORNIA) 9. Mai 1997 siehe Seite 6, Zeile 11 - Zeile 24; Ansprüche; Beispiele; Tabelle 1 ---	1, 3, 10
P, X	EP 0 861 900 A (ZUERICH ERZIEHUNGSDIREKTION) 2. September 1998 siehe Seite 8, Zeile 54 - Seite 9, Zeile 8 siehe Seite 14, Zeile 54 - Seite 15, Zeile 37; Ansprüche; Beispiele ---	1-3, 10-18
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24/02/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	KORTH, C. ET AL: "Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody" NATURE (LONDON) (1997), 390(6655), 74-77 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, 6. November 1997, XP002092791 siehe das ganze Dokument ---	1-3, 10-18
P,X	WO 98 35236 A (ENFER TECH LTD ;CONNOR MICHAEL O (IE)) 13. August 1998 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1-3,7-17
A	WO 93 23432 A (UNIV NEW YORK ;INST NAZIONALE NEUROLOGICO C B (IT)) 25. November 1993 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1-17

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Klanzichen

PCT/EP 98/05924

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9311155 A	10-06-1993	AU 675053 B	23-01-1997
		AU 3089292 A	28-06-1993
		CA 2124953 A	10-06-1993
		EP 0616613 A	28-09-1994
		JP 7501798 T	23-02-1995
		NZ 246059 A	28-08-1995
		US 5773572 A	30-06-1998
		ZA 9209392 A	27-07-1993
WO 9716728 A	09-05-1997	US 5750361 A	12-05-1998
		AU 7601296 A	22-05-1997
EP 0861900 A	02-09-1998	WO 9837210 A	27-08-1998
		AU 6498698 A	09-09-1998
WO 9835236 A	13-08-1998	AU 6004698 A	26-08-1998
WO 9323432 A	25-11-1993	AU 4376093 A	13-12-1993